

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	Format
<input type="checkbox"/> Clear Selections	Display Selected
Print/Save Selected	Free
Send Results	

1. 1/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

004823823

WPI Acc No: 1986-327164/198650

XRAM Acc No C86-141610

Alkaline protease(s) stable in highly alkaline conditions -
produced from *Bacillus* genus and used to improve washing ability of
detergents

Patent Assignee: LION CORP (LIOY)

Inventor: NEGI T; NISHINO T; ODERA M; SHIMOGAKI H; TAKEUCHI K

Number of Countries: 008 Number of Patents: 012

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
EP 204342	A	19861210	EP 86107708	A	19860606	198650	B
JP 61280268	A	19861210	JP 85123021	A	19850606	198704	
JP 61280278	A	19861210	JP 85123022	A	19850606	198704	
DK 8602686	A	19861207				198718	
JP 62146594	A	19870630	JP 85286944	A	19851220	198731	
US 4797362	A	19890110	US 86870018	A	19860603	198905	
JP 90055034	B	19901126	JP 85286944	A	19851220	199051	
JP 91000997	B	19910109	JP 85123022	A	19850606	199105	
JP 91079987	B	19911220	JP 85123021	A	19850606	199204	
EP 204342	B	19920205				199206	
DE 3683802	G	19920319				199213	
CA 1297821	C	19920324				199218	

Priority Applications (No Type Date): JP 85286944 A 19851220; JP 85123021 A 19850606; JP 85123022 A 19850606

Cited Patents: 2 Jnl. Ref: A3...8843; EP 220921; FR 2176835; JP 49071191;
No-SR. Pub. JP 74071191

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 204342 A E 87

Designated States (Regional): DE FR GB NL

EP 204342 B

Designated States (Regional): DE FR GB NL

Abstract (Basic): EP 204342 A

Novel alkaline protease Ya has the properties (a) activity decomposes various proteins in highly alkaline conditions, (b) substrate specificity: remarkably specific to insoluble proteins, partic. to keratin, (c) optimal pH pH 10-12.5 when reacted at 35 deg. C for 10 mins. on a casein substrate, (d) pH range for stability: pH 6.5-13 when incubated at 25 deg. C for 24 hrs. on a casein substrate, (e) optimal temp. 70 deg. C when reacted at pH 10.5 on a casein substrate, (f) thermal stability: at least 90% of the activity remains after incubation at pH 10.5 and 60 deg. C for 10 mins. (g) absorption spectrum: max. absorption at 276 nm in 50 mM Tris-HCl buffer of pH 8, (h) effect of metal ions: the activity is inhibited by Hg(2+) ion and thermal stability of the enzyme is increased by Ca(2+) when casein is used as a substrate, (i) effect of inhibitors when casein used as a substrate, the activity, the activity is not inhibited by EDTA and PCMB (p-chloromercury benzoate) but inhibited by DFP (diiso-propylfluorophosphate) and PMSF (phenylmethyl-sulphonyl fluoride), (j) effect of surfactants: when stored in heavy duty liq. detergent at 40 deg. C for 1 month, the full activity remains at pH 9 and 50% of the activity at pH 10.5, (k) mol. wt. 21.000 (gel

filtration) and (P) isoelectric point : 10.1.

A novel alkaline protease Yb is similarly characterised. Novel alkaline protease-producing proteases comprise *Bacillus spY* (FERM BP-1029), *spP* (FERM BP-1030), *spK* (FERM BP-1031) and *spX* (FERM BP-1032).

USE/ADVANTAGE - The proteases have excellent stability in highly alkaline conditions in the presence of detergent constituents and contribute to improving washing ability. They can be used in heavy duty detergents. (87pp Dwg. No. 0/23)

EP 204342 B

Novel alkaline protease Ya has the properties (a) activity decomposes various proteins in highly alkaline conditions, (b) substrate specificity: remarkably specific to insoluble proteins, partic. to keratin, (c) optimal pH: pH 10-12.5 when reacted at 35 deg. C for 10 mins. on a casein substrate, (d) pH range for stability: pH 6.5-13 when incubated at 25 deg. C for 24 hrs. on a casein substrate, (e) optimal temp. 70 deg. C when reacted at pH 10.5 on a casein substrate, (f) thermal stability: at least 90% of the activity remains after incubation at pH 10.5 and 60 deg. C for 10 mins. (g) absorption spectrum: max. absorption at 276 nm in 50 mM Tris-HCl buffer of pH 8, (h) effect of metal ions: the activity is inhibited by Hg(2+) ion and thermal stability of the enzyme is increased by Ca(2+) when casein is used as a substrate, (i) effect of inhibitors when casein used as a substrate, the activity, the activity is not inhibited by EDTA and PCMB (p-chloromercury benzoate) but inhibited by DFP (diiso-propylfluorophosphate) and PMSF (phenylmethyl-sulphonyl fluoride), (j) effect of surfactants: when stored in heavy duty liq. detergent at 40 deg. C for 1 month, the full activity remains at pH 9 and 50% of the activity at pH 10.5, (k) mol. wt. 21,000 (gel filtration) and (P) isoelectric point : 10.1.

A novel alkaline protease Yb is similarly characterised. Novel alkaline protease-producing proteases comprise *Bacillus spY* (FERM BP-1029), *spP* (FERM BP-1030), *spK* (FERM BP-1031) and *spX* (FERM BP-1032).

USE/ADVANTAGE - The proteases have excellent stability in highly alkaline conditions in the presence of detergent constituents and contribute to improving washing ability. They can be used in heavy duty detergents. (87pp Dwg. No. 0/23)

Title Terms: ALKALINE; PROTEASE; STABILISED; HIGH; ALKALINE; CONDITION; PRODUCE; BACILLUS; GENUS; IMPROVE; WASHING; ABILITY; DETERGENT

Derwent Class: D16; D25

International Patent Class (Additional): C11D-003/38; C12N-001/20; C12N-009/54; C12R-001/07

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="checkbox"/> Print/Save Selected	<input type="checkbox"/> Send Results	<input type="checkbox"/> Display Selected	Format
					Free

© 2003 The Dialog Corporation

⑪ 公開特許公報 (A)

昭61-280278

⑤ Int. Cl.⁴

C 12 N 9/54
 C 11 D 3/386
 (C 12 N 9/54
 C 12 R 1:07)

識別記号

府内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)12月10日

7421-4B
7144-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全12頁)

⑥ 発明の名称 アルカリプロテアーゼ

⑦ 特願 昭60-123022

⑧ 出願 昭60(1985)6月6日

⑨ 発明者 竹内 啓二 東京都世田谷区上祖師谷1丁目6番8号

⑩ 発明者 西野 隆司 小田原市曾比2421の1

⑪ 発明者 霜垣 久夫 南足柄市塙原2160-1 狩川第1コーポ201号

⑫ 発明者 祢宜 太兵衛 藤沢市鶴沼東2丁目1番311藤次ビルジ1-311

⑬ 出願人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号

⑭ 代理人 弁理士 鈴江 武彦 外2名

明細書

1. 発明の名称

アルカリプロテアーゼ

2. 特許請求の範囲

次の理学的性質を有するアルカリプロテアーゼ。
 (イ) 作用：高アルカリ条件下で各種の蛋白質を分解する。

(ロ) 基質特異性：不溶性蛋白質、特にケラチンに対して著しい特異性を示す。

(ハ) 至適pH：カゼインを基質として35℃で10分間反応させた場合、pH10.0ないし12.5において作用が至適である。

(ニ) 安定pH範囲：カゼインを基質として25℃で24時間処理した場合、pH6.5ないし13.0の範囲において作用が安定である。

(ホ) 至適温度：カゼインを基質としてpH10.5で反応させた場合、温度70℃において作用が至適である。

(ヘ) 耐熱性：pH10.5で60℃にて10分間熱処理した場合、90%以上活性が残存する。

(ト) 吸収スペクトル：pH8.0の50mMトリス-塩酸緩衝液中において紫外領域280nmに極大吸収を示す。

(チ) 金属イオンの影響：カゼインを基質とした場合、Hg²⁺では活性が阻害され、Ca²⁺では活性の熱安定性が増す。

(リ) 阻害剤の影響：カゼインを基質とした場合、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）およびPCM（D-クロロマー-キュリー安息香酸）では活性が阻害されないが、DFP（ジイソプロピルフルオロリン酸）およびPMSF（フェニルメタンスルフォニルフルオリド）では活性が阻害される。

(ヌ) 界面活性剤の影響：界面活性剤中で40℃にて1ヶ月間保存した場合、pH9.0では100%活性が残存し、pH10.5では50%活性が残存する。

(ル) 分子量：21000（トヨバルHW-55によるゲル濃過法）。

(ヲ) 等電点：10.1（ファルマライト3-10による等電点電気泳動法）。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、バチルス属の1新菌株を培養することにより得られる、新規アルカリプロテアーゼに関する。特に、洗浄剤全般に配合して優れた安定性を有し、洗浄力の改善に寄与する新規アルカリプロテアーゼに関する。

[従来技術とその問題点]

近年、洗浄剤、特に液体洗浄剤の洗浄力を更に向上させるために、洗浄剤原液のpHをよりアルカリ性にするとともに、プロテアーゼ、アミラーゼ、リバーゼ、セルラーーゼ等の各種加水分解酵素の配合が試みられている。その中でも蛋白質分解酵素なからんすぐアルカリプロテアーゼは、洗浄剤のみでは落ちにくい蛋白汚垢を分解し、洗浄力の改善に寄与する。そのため、該酵素を洗浄剤に添加することが不可欠である。一般的にアルカリプロテアーゼとして、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)、バチ

において優れた安定性を有し、洗浄力の改善に寄与するアルカリプロテアーゼを提供することを目的とする。

本発明者らは、上記の問題を克服したアルカリプロテアーゼを得るために、広く自然界よりアルカリプロテアーゼ産生菌を検索した結果、バチルス属に属する1菌種が、前記の性質において公知のアルカリプロテアーゼより優れたアルカリプロテアーゼを培地中に产生することを見出だした。該酵素を产生する菌株は、微研菌奇第8088号 バチルス・エスピー(*Bacillus sp.*)Yである。本発明者らは、該酵素を以下に述べる方法により単離精製し、種々の性質を従来の酵素と比較しながら検討した。

本発明のアルカリプロテアーゼ(以下、Ya酵素と称する)の単離精製法は第1図に示したとおりである。まず微生物培養液を、10000rpmで5分間遠心分離し上清を得た。次に該上清を、70%飽和の硫酸塩析にかけた。更に得られる沈澱物を20mMトリス-塩酸緩衝液(Caイオン

ルス・アルカロフィルス(*Bacillus alcalophilus*)、その他ストレプトマイセス属(*Streptomyces*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、アースロバクター属(*Arthrobacter*)、ザリウム属(*Fusarium*)等の種々の微生物により生産されるものが知られている。具体的1例として、バチルス・リケニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)より単離されたアルカリプロテアーゼ[商品名アルカラーゼ、ノボ社(以下本文中A酵素と称する)]が当該分野でよく知られている。しかし、これらの酵素は、高pHおよび界面活性剤溶液中で直ちに失活するため、液体洗浄剤に配合することは困難である。本発明では、上記A酵素とともにバチルス・アルカロフィルス(*Bacillus alcalophilus*)No.221(ATCC 21522)より単離されたアルカリプロテアーゼ[堀越ら、理研(以下本文中B酵素と称する)]を比較例とした。

[問題点を解決するための手段]

本発明は、洗浄剤成分共存下の高アルカリ条件

2mM添加、pH7.2)に溶解し、同緩衝液に対して透析した。続いて該溶液を、ジエチルアミノエチル(DEAE)-53セルロースのアニオニ交換クロマトグラフィーにかけ10mMホウ酸緩衝液(pH9.3)で溶出させ、非吸着画分を得た。尚続いて該非吸着画分を、再び70%飽和の硫酸塩析にかけた。得られた沈澱物を再び20mMトリス-塩酸緩衝液(Caイオン2mM添加、pH7.2)に溶解し、同緩衝液に対して透析した。更にまた該溶液を、トヨバールHW-55のゲル通過クロマトグラフィーにかけ、20mMトリス-塩酸緩衝液(Caイオン2mM添加、pH7.2)で溶出させ、活性のある画分を集めめた。尚また該画分を70%飽和の硫酸塩析にかけ、得られた沈澱物を20mMトリス-塩酸緩衝液(Caイオン2mM添加、pH7.2)に対して透析した。最後に変性蛋白質を除去するために、透析後の活性画分をミリポアフィルターで通過し、精製Ya酵素を得た。

[作用]

上述の方法に従って得られたY_a酵素の様々な性質を調べた。

該Y_a酵素の作用は、蛋白質の加水分解である。その酵素の基質特異性を第1表に示す。

第1表

酵素	基質 ケラチン	ヘモグロビン	卵白	卵黄
A酵素	100	100	100	100
Y _a 酵素	187	99	28	82

A酵素の活性を100としたときの相対分解率
条件：温度 35℃

pH 10.5 (50 mMホウ酸緩衝液)

反応時間 60分

基質濃度 1% ただしヘモグロビンは
0.4%

酵素使用量 100APU/ml ただし
卵白は500APU/ml

ホウ酸緩衝液による活性の測定は、アンソノ

%を含む20 mMの各緩衝液に各酵素を約400 APU/mlとなるように加え、35℃で10分間反応させ活性を測定した。至適pHでの活性を100とするときの各pHでの相対活性を求めた。安定pH領域を調べるに当たっては、20 mMの各緩衝液に各酵素を約400APU/mlとなるように加え、25℃で24時間インキュベートした後、活性を測定した。インキュベート前の活性を100として各pHでの相対活性を求めた。第2図から分るように、本Y_a酵素の至適pHは10.0ないし12.5であり、安定pH領域は6.5ないし13.0である。

更に、本Y_a酵素の至適温度と耐熱性を第3図に示す。至適温度を調べるに当たっては、基質として0.6%のカゼインを含むpH 10.5の緩衝液に各酵素を加え、10分間各温度で反応させた。35℃での活性を100として各温度での相対活性を求めた。耐熱性は次のようにして調べた。

50 mMホウ酸-NaOH緩衝液(35℃でpH 10.5)に約400APU/mlの酵素を加え、

一荻原の変法に従った。反応後遠心した反応溶液の吸光度を275 nmにて測定した。1分間にチロシン1 μgを遊離させる酵素活性を1アルカリプロテアーゼ単位(APU)とした。

この表から、本Y_a酵素はケラチンに対する特異性の強いことが分る。

次に、本Y_a酵素の至適pHおよび安定pH領域のグラフ図を第2図に示す。用いた緩衝液は以下のとおりである。

pH領域	緩衝液
3.5 - 5.5	酢酸
4.5 - 7.0	クエン酸
6.0 - 8.0	リン酸
7.5 - 9.0	トリス-HCl
8.0 - 9.0	ホウ酸-HCl
9.0 - 10.5	グリシン-NaOH
9.5 - 11.0	ホウ酸-NaOH
11.0 - 12.0	リン酸-NaOH
12.0 - 13.0	KCl-NaOH

至適pHを調べるに当たっては、カゼイン0.6

各温度で10分間熱処理し、氷冷した後、活性を測定した。第3図から分るように、本Y_a酵素の至適温度は70℃であり、55℃の温度まで活性が維持される。

続いて、本Y_a酵素の紫外吸収スペクトルを第4図に示す。試料を50 mMのトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶かし、紫外吸収スペクトルを測定したところ、276 nmの波長で極大吸収を示した。その波長での吸光係数E_{1cm}^{1%}は7.4と計算された。

尚次に、金属イオンの本Y_a酵素の活性に与える影響を調べた。その結果を第2表に示す。20 mMホウ酸-NaOH緩衝液(pH 10.5)に本Y_a酵素を約400APU/mlを加え、更に各種金属塩を1 mMの濃度で添加し、各所定の条件下処理後残存活性を測定した。数値は0分の活性を100としてその相対活性で表わす。

第2表

金属塩 金属性	処理条件 25°C 60分	40°C 60分	40°C 24時間
ナシ	99	98	85
NaCl	100	100	91
KCl	98	98	85
LiCl	100	100	86
CoCl ₂	100	100	91
NiCl ₂	100	100	91
BaCl ₂	100	100	92
FeSO ₄	100	99	79
CaCl ₂	100	100	96
CuSO ₄	86	74	26
MgSO ₄	100	100	89
Na ₂ SO ₄	100	100	90
MnCl ₂	100	100	80
AgNO ₃	87	80	6
HgCl ₂	22	18	2
CdCl ₂	81	81	75
ZnCl ₂	100	97	85

第3表

阻害剤	濃度	相対活性	備考
ナシ		100	
尿素	6M	130	蛋白質変性剤
EDTA	5mM	97	金属プロテアーゼ阻害剤
DFP	1mM	0	セリンプロテアーゼ阻害剤
PMSF	1mM	0	セリンプロテアーゼ阻害剤
HgCl ₂	1mM	106	SH酵阻害剤
PCMB	1mM	122	SH酵阻害剤
アンチバイン	100μg./ml	124	SH酵阻害剤
キモスタチン	100μg./ml	77	Ca依存性プロテアーゼ阻害剤

この表から、硝酸銅、硝酸銀、塩化水銀、塩化カドミウムの添加により本Y_a酵素の活性は阻害されるが、塩化カルシウムの添加では活性の熱に対する安定性が増すことが分る。

尚既いて、本Y_a酵素に対する各種阻害剤の影響を調べた。条件および方法は以下のとおりである。50mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)で本Y_a酵素を800APU/mlになるよう調製した。各阻害剤を添加して、35°Cで30分間インキュベート後、残存活性を測定した。値は、阻害剤無添加のものを100とした相対活性で示した。その結果を第3表に示す。

この表から分るように、本Y_a酵素は、活性中心にセリンを有するプロテアーゼである。

尚更に、液体界面活性剤中の本Y_a酵素の安定性を第5図に示す。各酵素を液体ヘビー洗浄剤原液中で40°Cにて1箇月間保存した後、各酵素のケラチンに対する分解活性を測定した。グリシン-NaOHの緩衝液でpHを変化させた。また、各酵素を液体ヘビー洗浄剤原液中にて温度を変化させて1箇月間保存した後、各酵素のケラチンに対する分解活性を測定した。グリシン-NaOHの緩衝液でpHを11に定めた。第5図から分るように、本Y_a酵素の液体界面活性剤中の安定性については、40°Cにて1箇月間保存した場合、pH 9.0では100%活性が残存し、pH 10.0では50%活性が残存する。また温度依存性については、pH 11にて1箇月保存した場合、25°C以下では100%活性が残存し、35°Cでは65%活性が残存する。このように、本Y_a酵素は、公知のアルカリプロテアーゼに比べると、液体界面活性剤中の安定性について優れているこ

とが分る。

尚統いて、本Y_a酵素の分子量をゲル通過クロマトグラフィーにより調べた。充填剤には、トヨバル HW-55 を用い、20 mMトリス-塩酸緩衝液 (C₂イオン2 mM添加、pH 7.2) を溶出液とした。標準蛋白に以下の蛋白(分子量)を用いて検量線を作成した。卵白アルブミン(43000)、サモライシン(37500)、ズブチリシン(27600)、キモトリプシノゲン(25700)、ミオグロビン(17200)、チトクロームC(11700)を用いた。検量線を第6図に示す。この方法により、本Y_a酵素の分子量は21000と決定した。

また次に、本Y_a酵素の等電点を等電点電気泳動法により調べた。カラム用担体には、ファルマライト3-10を用いた。本酵素の等電点電気泳動模様を第7図に示す。この方法により本Y_a酵素の等電点は10.1と決定した。

また更に、本Y_a酵素のアミノ酸組成 [アミノ酸分析器JLC-200A(日本電子)使用]を

調べた。その組成をその他のプロテアーゼのものと比較して第4表に示す。

第4表

酵素 アミノ酸	Y _a 酵素 (a)	B酵素 (b)	A酵素 (c)	ズブチリシン BPN(c)	ズブチリシン NOVO(d)
トリプトファン	5	5	1	3	3
リシン	7	6	9	11	6
ヒスチジン	5	8	5	6	5
アルギニン	5	8	4	2	3
アスパラギン酸	20	18	28	28	20
スレオニン	11	18	19	13	14
セリン	22	23	32	37	37
グルタミン酸	9	16	12	15	12
アロリン	9	16	9	14	10
グリシン	22	39	35	33	25
アラニン	20	45	41	37	27
バリン	9	27	31	30	20
メチオニン	2	4	5	5	3
イソロイシン	6	9	10	13	12
ロイシン	10	22	16	15	12
チロシン	6	7	13	10	9
フェニルアラニン	4	2	4	3	2
システィン	0	0	0	0	0

(a) K.ホリコシ, Agr. Biol. Chem., Vol.35, No.9, 1407 (1971)
より引用。

(b) E.L.スミスら, J.Biol. Chem., 243, 2181, (1968) より引用。

(c) F.S.マーカンド, J.Biol. Chem., 242, 5198 (1967) より引用。

(d) D.ツルら, Agr. Biol. Chem., 31, 330 (1967) より引用。

また統いて、本Y_a酵素の元素分析値を第5表に示す。

第5表

C	44.82%
H	7.27%
N	13.96%
S	0.33%

最後にまとめとして、本Y_a酵素の各種性状をA酵素とB酵素のものと比較して第6表に示す。

第6表

[実施例]

	Y ₂ 酵素	A酵素	B酵素
生産菌	バチルス SD Y株	バチルス リケニ フォルミス	バチルス アルカロ フィルス
至適pH	10.0-12.5	10.0-10.5	11.7-12.5
安定pH領域	6.5-13.0	5.5-11.5	*5.0-10.0
至適温度	70°C	60°C	*60°C
耐熱性	<55°C	<40°C	<50°C
安定化剤	Caイオン	Caイオン	Caイオン
分子量	21000	27600	30000
等電点	10.1	9.4	<9.4
吸光係数	7.4	*8.6	*12.5
酵素のタイプ	セリンプロテアーゼ	セリンプロテアーゼ	セリンプロテアーゼ

*Agr. Biol. Chem., Vol. 35, No. 9 (1971) より引用。

**生化学データブック第1巻より引用。

菌株の培養

可溶性テンブン2%、硫酸マグネシウム0.02%を含む液体培地と、乾燥酵母1%、リン酸水素二カリウム0.1%を含む液体培地とを、それぞれ121°Cにて20分間別々に滅菌した後、各20mlを500mlの坂口フラスコに分注し、更に滅菌済みの炭酸ナトリウムを終濃度1%となるよう該フラスコに加え、50mlの培養液を調製した。該培養液にバチルス・エスピー (Bacillus sp.) Y株を接種し、該培養液を30°Cで15時間培養し、種培養液を調製した。該種培養液100mlを同じ組成の培地3.5lの入った圓筒タンクに加え、該タンクに30°Cで毎分3.5lの空気を送りながら70時間通気攪拌培養した。得られた培養液3.5l (2500APU/ml) を遠心分離により除菌し、上清約3.0lを得た。

Y₂酵素の精製

このようにして得た培養上清2650mlを冷却攪拌しながら該上清に硫酸1250gを添加する

と、アルカリプロテアーゼが析出した。該沈澱物を遠心分離により回収し、該沈澱を20mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2, Caイオン2mMを含む) 500mlに溶解し、該溶液を透析膜に入れ同緩衝液に対して一晩透析した。ここに890mlの粗酵素液 (6600APU/ml, 比活性4350APU/mg蛋白)を得た。夾雜蛋白の除去および脱色のため、10mMホウ酸緩衝液 (pH 9.3) で平衡化したDEAE-53を充填したカラムに該溶液を展開させ、同緩衝液で溶出させた。非吸着の活性画分を集めたところ、全量は420ml、活性は11300APU/ml、比活性は11800APU/mg蛋白であった。ここまで精製度は6.2倍、回収率は72%であった。更に、該画分に硫酸198gを添加し、蛋白を透析させた。続いて、該沈澱物を20mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2, Caイオン2mMを含む) 30mlに溶かし、該溶液をトヨバールHW-55のゲル透析クロマトグラフィーにかけ、同緩衝液で展開させた。得られた活性画分を硫酸培折し、沈

澱物を同緩衝液10mlに溶解し、同緩衝液に対して透析した。透析後、ミリポアフィルターで不溶性蛋白を除去し、活性210000APU/ml、比活性15900APU/mg蛋白の溶液16.4mlを得た。この精製過程を第7表にまとめて示す。

第7表

容積 (ml)	活性 (APU, %)	蛋白質 (mg/ml)	全活性 (APU)	比活性 (APU/mg蛋白)	収率 (%)	
					培養上清	100
2630	2500	1.3	660万	1900		
890	6600	1.5	590万	4350	90	
420	11300	0.96	475万	11800	72	
ゲル通過	130	29000	2.1	377万	13800	57
濃縮		16.4	210000	13.2	344万	52

前記組成だけの試料をサンプル-1とし、前記組成物に本Y_a酵素を5000APU/kg添加させた試料をサンプル-2とした。また市販の液体洗浄剤の試料をサンプル-0とした。洗浄装置には、U.S.-テスチング社のTerg-O-Tometer(ターゴットメーター)を使用し、蛋白質配合糊式汚垢布10枚、セバム布および洗浄メリヤス布を入れ、浴比30倍に合せ、25℃で120rpmにて10分間洗浄した。洗浄液には、洗浄剤濃度0.1%のもの90mlを用い、置きは900mlの水で3分間行なった。使用水には、3°DHのものを用いた。尚、洗浄力指数は、油化学、30.432(1981)に示された式に準じて計算した。該結果を第8表に示す。

第8表

試料	洗浄力指数
サンプル-0 (pH 7)	6.6
サンプル-1 (pH 11)	7.4
サンプル-2 (pH 11)	7.9

次に、精製済みの本Y_a酵素を試料としたゲル通過クロマトグラフィーの溶出曲線を第8図に示す。樹脂はトヨバールHW-55を用い、溶出液は20mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.2、Caイオン2mMを含む)を用い、展開を上昇法により実施した。また、精製済みの本Y_a酵素を試料とした高速液体クロマトグラフィーの溶出曲線を第9図に示す。機種はウォーターズWISP-710Dを用い、I-125カラムを2本直列させた。50mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で溶出させた。この2つの図から明らかのように、上記の精製により本Y_a酵素は完全に精製された。

本Y_a酵素の洗浄力

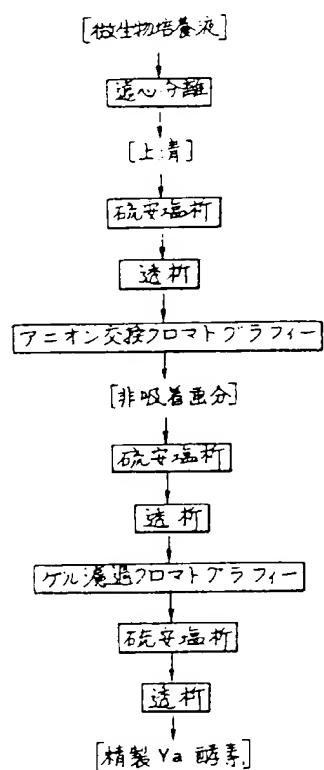
洗浄剤の基準組成として、アルキルポリエトキシ硫酸ナトリウム20%、アルコールエトキシレート10%、エタノール6%、トルエンスルホン酸ナトリウム6%、アルカリビルダー(グリシン6.6%、NaOH 3.3%)、水(バランス)の配合物を準備した。数値の単位はいずれも重量パーセントである。

この結果から、本Y_a酵素を含むサンプルは、本Y_a酵素を含まないサンプルよりも明らかに洗浄作用が強く、本Y_a酵素は液体ヘビー洗浄剤の洗浄力の改善に寄与することが分る。

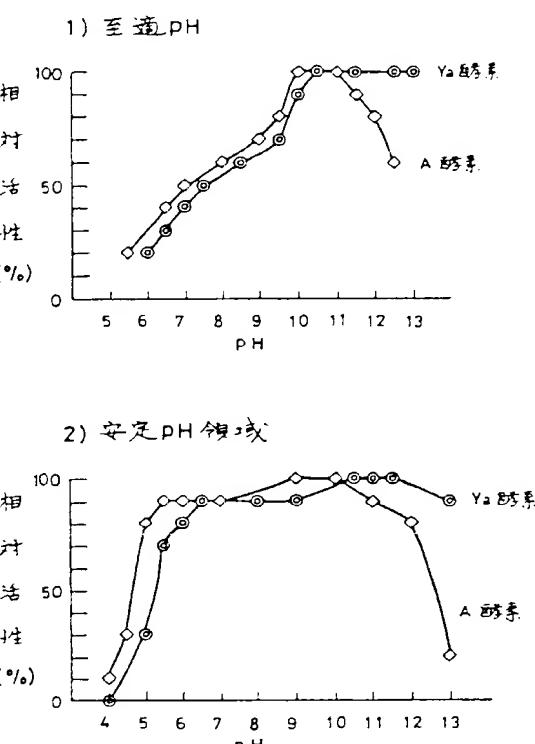
4. 図面の簡単な説明

第1図は本Y_a酵素の精製段階を示すフローシートである。第2図は本Y_a酵素の至適pHおよび安定pH領域を示すグラフ図である。第3図は本Y_a酵素の至適温度および耐熱性を示すグラフ図である。第4図は本Y_a酵素の紫外領域吸収スペクトル曲線を示すグラフ図である。第5図は本Y_a酵素の界面活性剤中の安定性を示すグラフ図である。第6図は本Y_a酵素の分子量決定の際の検量線を示すグラフ図である。第7図は本Y_a酵素の等電点電気泳動模様を示すグラフ図である。第8図は本Y_a酵素のゲル通過クロマトグラフィー溶出曲線を示すグラフ図である。第9図は本Y_a酵素の高速液体クロマトグラフィー溶出曲線を示すグラフ図である。

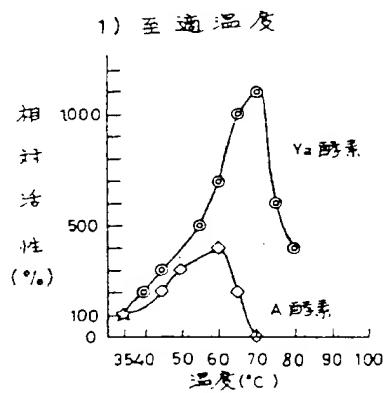
第1図



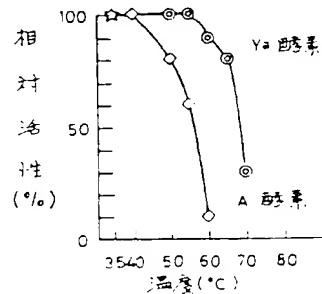
第2図



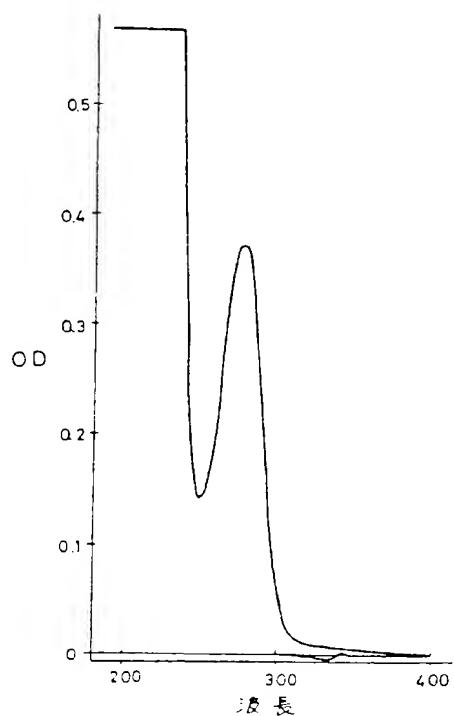
第3図

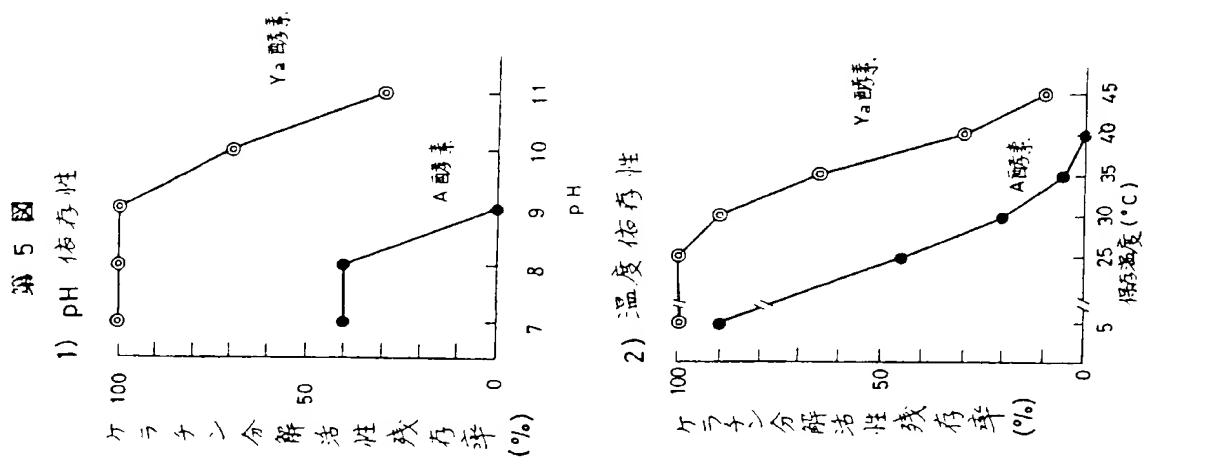


2) 耐熱性

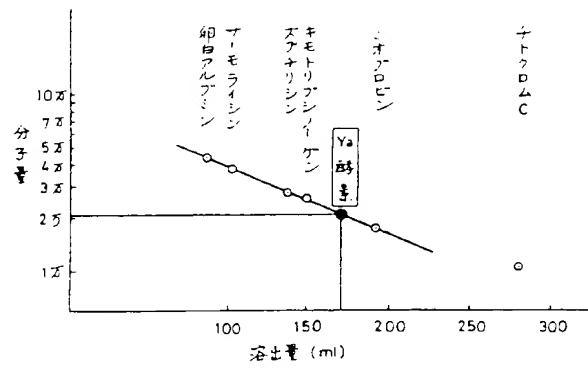


第4図

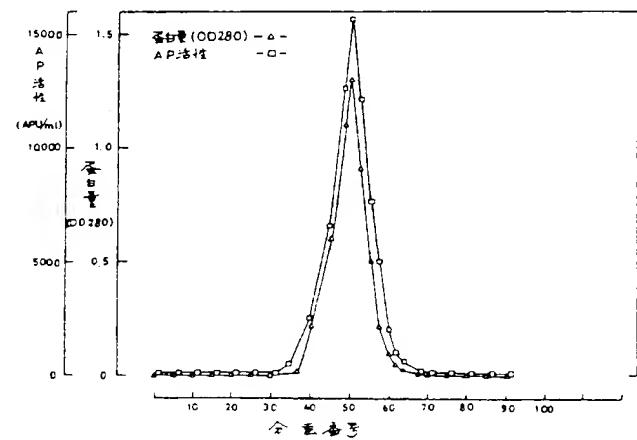




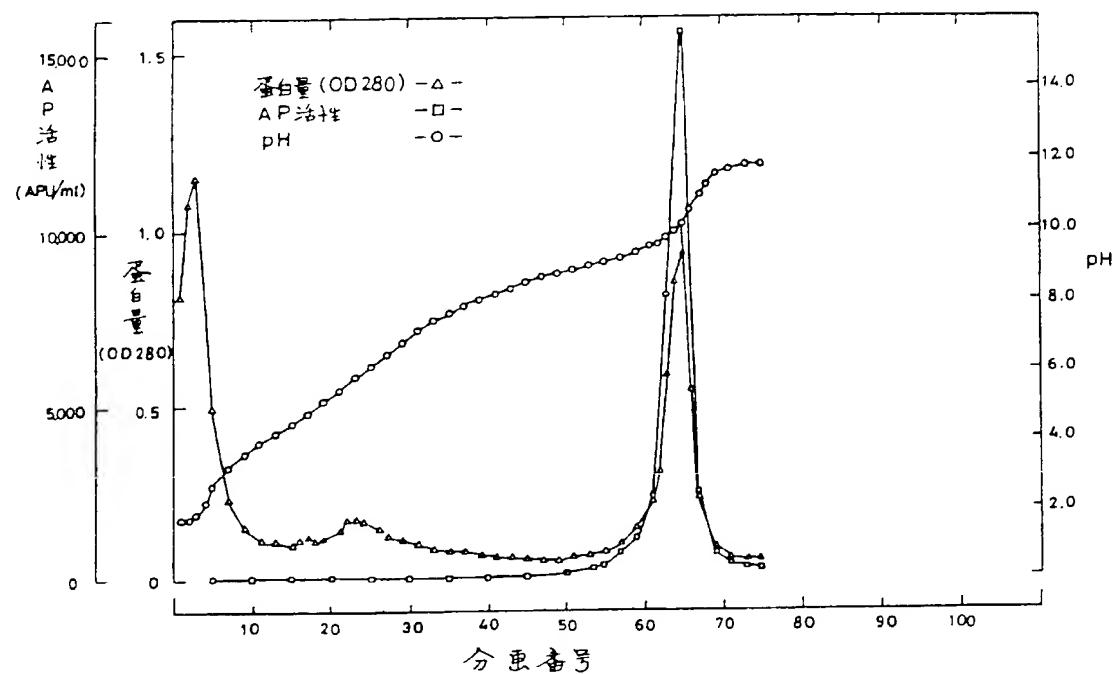
第6図



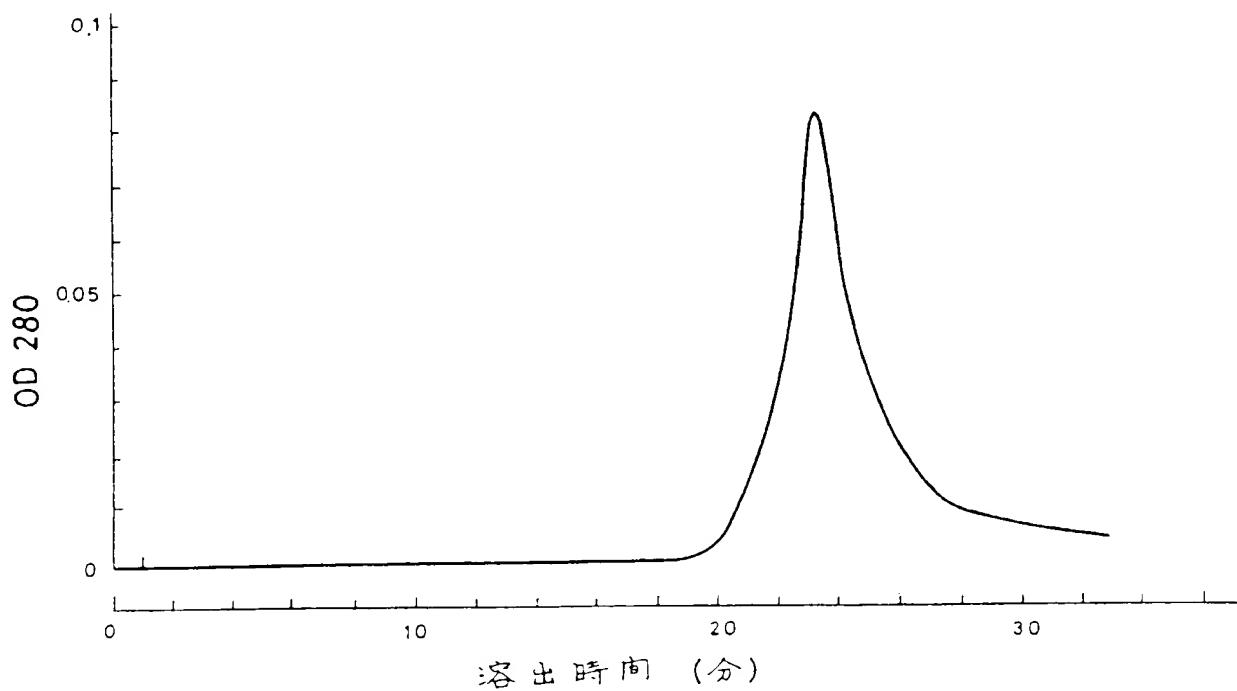
第8図



第 7 図



第 9 図



手続補正書

昭和年60.7.5
月日

特許庁長官 志賀 学殿

1. 事件の表示

特願昭60-123022号

2. 発明の名称

アルカリプロテアーゼ

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(676) ライオン株式会社

4. 代理人

東京都港区虎ノ門1丁目26番5号第17森ビル

〒105 電話 03(502)3181 (大代表) 
(5847) 弁理士 錦 江 武 彦 

5. 自発補正

6. 補正の対象

明細書、図面

特許
60.7.5
付

「2500APU/ε」を「2500APU/ε」
と訂正する。

(9) 明細書第22頁第2行目ないし第3行目の
「不溶性蛋白」を「不溶変性蛋白質」と訂正する。

(10) 明細書第23頁第2行目の「収率」を
「回収率」と訂正する。

(11) 図面第1図を別紙の通り訂正する。

7. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙の通り訂正する

(2) 明細書第3頁第20行目の

「licheniformis」を「licheniformis」と訂正する。

(3) 明細書第4頁第7行目ないし第8行目の
「licheniformis」を「licheniformis」と訂正する。

(4) 明細書第11頁第5行目の「NaC」を
「NaCl」と訂正する。

(5) 明細書第13頁第8行目、第9行目、第
10行目の「SH酵素阻害剤」を「SH酵素阻害剤」と訂正する。

(6) 明細書第17頁第22行目の「Vol. 35, No. 9, 1407 (1971)」を「第35巻第9号1407頁1971年」と訂正する。

(7) 明細書第19頁第14行目の「Vol. 35, No. 9 (1971)」を「第35巻第9号1971年」と訂正する。

(4) 明細書第20頁第16行目の

2. 特許請求の範囲

次の理学的性質を有するアルカリプロテアーゼ。

(イ) 作用：高アルカリ条件下で各種の蛋白質を分解する。

(ロ) 基質特異性：不溶性蛋白質、特にケラチンに対して著しい特異性を示す。

(ハ) 至適pH：カゼインを基質として35℃で10分間反応させた場合、pH 10.0ないし12.5において作用が至適である。

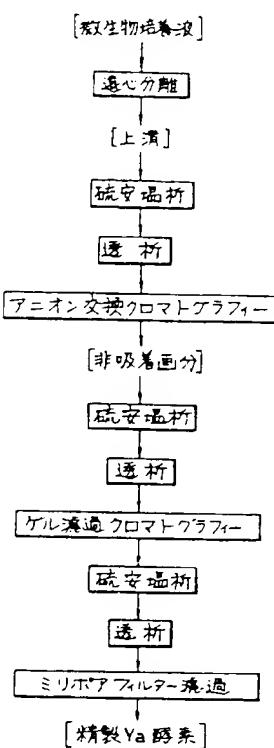
(ニ) 安定pH範囲：カゼインを基質として25℃で24時間処理した場合、pH 6.5ないし13.0の範囲において作用が安定である。

(ホ) 至適温度：カゼインを基質としてpH 10.5で反応させた場合、温度70℃において作用が至適である。

(ヘ) 耐熱性：pH 10.5で60℃にて10分間熱処理した場合、90%以上活性が残存する。

(ト) 吸收スペクトル：pH 8.0の5.0 mMのトリス-塩酸緩衝液中において紫外領域276nmに極大吸収を示す。

第1図



(チ) 金属イオンの影響：カゼインを基質とした場合、Hリオノンでは活性が阻害され、Caイオンでは活性の熱安定性が増す。

(リ) 阻害剤の影響：カゼインを基質とした場合、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）およびPCM B（ローカロロマーキュリー安息香酸）では活性が阻害されないが、DFP（ジイソプロピルフルオロリン酸）およびPM S F（フェニルメタンスルフォニルフルオリド）では活性が阻害される。

(ヌ) 界面活性剤の影響：界面活性剤中で40℃にて1箇月間保存した場合、pH 9.0では100%活性が残存し、pH 10.5では50%活性が残存する。

(ル) 分子量：21000（トヨバールHW-55によるゲル通過法）。

(ヲ) 等電点：10.1（ファルマライト3-10による等電点電気泳動法）。

出願人代理人 弁理士 鈴江武彦

手 続 補 正 書

61.5.21
昭和 年 月 日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

特願昭60-123022号

7. 補正の内容

- (1) 明細書第5頁第10ないし11行目の「微研菌寄第8088号」を「微研条寄第1029号」と訂正する。
- (2) 受託証1通別紙の通り補正する。

2. 発明の名称

アルカリプロテアーゼ

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(676) ライオン株式会社

4. 代理 人

住所 東京都港区虎ノ門1丁目26番5号 第17森ビル
〒105 電話 03(502)3181(大代表) 

氏名 (5847) 弁理士 鈴江武彦 

5. 自発補正

6. 補正の対象

明細書、受託証



方
案
審
査
室

